



The Novel Anticancer Drug KRN5500 Interacts with, but Is Hardly Transported by Human P-Glycoprotein

高良, 恒史

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2112

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002112>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	たか 高 良 恒 史	（和歌山県）
博士の専攻分野の名称	博 士（医 学）	
学位記番号	博い第1255号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成12年3月31日	
学位論文題目	The Novel Anticancer Drug KRN5500 Interacts with, but Is Hardly Transported by Human P-Glycoprotein (新規抗癌剤 KRN5500 のヒト P 糖蛋白質との相互作用と膜輸送)	
審査委員	主査 教授 奥 村 勝 彦 教授 春 日 雅 人 教授 久 野 高 義	

論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

癌細胞が複数の抗癌剤に対して耐性を示す多剤耐性（MDR）は、癌化学療法を行う上で重要な問題となっている。1970年後半、耐性癌細胞の細胞膜上に過剰発現している P 糖蛋白質（P-gp）が発見され、続いて、P-gp が細胞内に取り込まれた抗癌剤を細胞外へ排出するポンプとして機能することが明らかとされた。さらには、実際に化学療法を施行された患者の癌細胞においても、P-gp が高発現しているという報告が相次いだことから、抗癌剤の最適な投与レジメンを決定する為に、抗癌剤が P-gp の基質であるか否かを明確にすることが重要であると認識されている。

本研究では、新規抗癌剤 KRN5500 と P-gp の相互作用について、ブタ腎上皮由来 LLC-PK₁細胞、並びに LLC-PK₁細胞にヒト *MDR1* cDNA をトランスフェクションし、P-gp を高発現した LLC-GA5-COL150細胞を用いて、細胞内薬物動態の観点から検討を行った。さらに、化学療法を施行された患者において有効性の低下が知られている vinblastine との比較を行った。

【実験材料及び方法】

（1）細胞培養

LLC-GA5-COL150細胞は、LLC-PK₁細胞にヒト *MDR1* cDNA を導入することにより樹立し、発現した P-gp は頂側膜上に局在化していることを確認している。両細胞は、10%FBS 含有 Medium199 を用い継代培養した。

（2）細胞増殖阻害

KRN5500 及び vinblastine の両細胞に対する増殖阻害効果は MTT 法により評価した。すなわち、96 ウェルのマルチプレートに細胞を播種し、種々の濃度の KRN5500 及び vinblastine を加えて96時間培養後、MTT 溶液を加えさらに4時間インキュベートした。その後、培養液を除去し、MTT の還元によって生じたホルマザンをジメチルスルフォキシドで溶解し、570 nm での吸光度を測定した。細胞増殖阻害率は、非処理群の細胞増殖に対する割合として求め、常法に従い50%増殖阻害濃度（IC₅₀）を算出した。

(3) P-gp の³H]azidopine 光標識に対する阻害

両細胞を nitrogen cavitation 法により破碎し、遠心分離により膜分画を得た。得られた膜分画を、KRN 5500あるいは vinblastine の存在下又は非存在下において³H]azidopine と20分間反応させた後、30分間の紫外線照射を行った。光標識した膜分画は、SDS-PAGE にて分離し、オートラジオグラフィーにて検出した。

(4) KRN5500及び vinblastine の細胞内蓄積及び経細胞輸送

両細胞を Transwell™ 上に単層培養した。¹⁴C]KRN5500又は³H]vinblastine を側底膜あるいは頂側膜側に添加し、経時的にレシーバー側の培養液を採取することにより経細胞輸送特性を評価した。さらに、実験終了直後、氷冷 PBS で細胞を洗浄し0.3N NaOH で細胞を溶解することにより細胞内蓄積量も測定した。得られた試料中の放射活性を液体シンチレーション法により測定した。

【結果】

(1) KRN5500及び vinblastine の細胞増殖阻害

KRN5500の LLC-GA5-COL150細胞に対する増殖阻害効果 (IC₅₀=79.4 nM) は、LLC-PK₁細胞 (72.7 nM) と比較してほぼ同等であった。一方、vinblastine の LLC-GA5-COL150細胞に対する IC₅₀値は697 nMであり、LLC-PK₁細胞 (8 nM) と比較して約90倍高い値を示した。

(2) KRN5500及び vinblastine の³H]azidopine 光標識に対する阻害

³H]Azidopine の P-gp への結合は、LLC-GA5-COL150細胞の膜分画のみで観察された。KRN5500による³H]azidopine 結合の阻害効果は濃度依存的であり、40 μM では部分的に、400 μM ではほぼ完全に阻害した。一方、vinblastine による阻害効果は、KRN5500と比較して顕著に強いものであった。

(3) KRN5500及び vinblastine の細胞内蓄積

¹⁴C] KRN5500を側底膜側に添加したとき、LLC-GA5-COL150細胞における細胞内蓄積量は、LLC-PK₁細胞と比較してわずかに低い程度であった。頂側膜側に添加したとき、LLC-GA5-COL150細胞における細胞内蓄積量は、LLC-PK₁細胞と比較して約3倍低いものの、MDR modulator PSC833による回復は認められなかった。一方、³H]vinblastine の場合、LLC-GA5-COL150細胞における細胞内蓄積量は、側底膜側もしくは頂側膜側に添加したいずれの場合でも、LLC-PK₁細胞と比較して約20-70倍低く、また PSC833により顕著に回復された。

(4) KRN5500及び vinblastine の経細胞輸送

LLC-GA5-COL150細胞における側底膜から頂側膜側への¹⁴C]KRN5500輸送は、LLC-PK₁細胞と比較してわずかに高い程度であった。また、LLC-GA5-COL150細胞における側底膜から頂側膜側への輸送は、反対方向の頂側膜から側底膜側への輸送と比較してわずかに高いだけであった。一方、³H]vinblastine の場合、LLC-GA5-COL150細胞における側底膜から頂側膜方向への輸送は、反対方向への輸送と比較して約20倍高く、また PSC833により顕著に阻害された。

【考察】

以上の結果から、KRN5500はヒト P-gp と相互作用するものの、P-gp によってほとんど輸送されないことが明らかとなった。また、ヒト P-gp と強く相互作用し、P-gp によって輸送された vinblastine と比較した結果、KRN5500は非常に特徴的な細胞内動態を示す抗癌剤であることが明らかとなった。vinblastine は、化学療法を施行された患者において、しばしば効果が減弱することが認められている。しかしながら、KRN5500は vinblastine とは異なる細胞内動態を示したことから、化学療法を施行された患者に対してさえ有用であることが示唆された。

さらに近年、P-gp の基質であるが P-gp によって輸送されない薬物 PSC833, nitrendipine 及び

progesterone が報告されている。これらの薬物の細胞内の蓄積は、P-gp の発現により影響されないことが示されており、KRN5500の細胞内動態もこれら薬物と類似していることが明らかとなった。従って、新規抗癌剤を開発する上で、P-gp の基質であるか否かを明確にするるとともに、実際にP-gp によって輸送されるか否かまでも明確にすることが重要であると考えられた。このような目的を遂行する上で、LLC-GA5-COL150細胞を用いた本実験系は有用であることが示された。

論文審査の結果の要旨

癌細胞が複数の抗癌剤に対して耐性を示す多剤耐性 (MDR) は、癌化学療法を行う上で重要な問題である。MDR の主要なメカニズムの一つとして、薬物輸送ポンプ P 糖蛋白質 (P-gp) の誘導が関与していると考えられている。従って、抗癌剤の最適な投与レジメンを決定する為には、抗癌剤が P-gp の基質であるか否かを明確にすることが重要となる。

本研究者は、新規抗癌剤 KRN5500 と P-gp の相互作用について、ブタ腎上皮由来 LLC-PK₁細胞、並びに LLC-PK₁細胞にヒト *MDR1* cDNA をトランスフェクションし、P-gp を高発現した LLC-GA5-COL150細胞を用いて、細胞内薬物動態の観点から検討を行った。さらに、化学療法を施行された患者において有効性の低下が知られている vinblastine との比較を行った。

KRN5500 の LLC-GA5-COL150細胞に対する増殖阻害効果は、LLC-PK₁細胞と比較してほぼ同等であったが、vinblastine の LLC-GA5-COL150細胞に対する IC₅₀値は、LLC-PK₁細胞と比較して約90倍高い値を示した。

[³H]Azidopine の P-gp への結合は、LLC-GA5-COL150細胞の膜分画のみで観察された。また、KRN5500による [³H]azidopine 結合の阻害効果は濃度依存的であり、40 μM では部分的に、400 μM ではほぼ完全に阻害した。一方、vinblastine による阻害効果は、KRN5500と比較して顕著に強いものであった。

[¹⁴C] KRN5500を側底膜側に添加したとき、LLC-GA5-COL150細胞における細胞内蓄積量は、LLC-PK₁細胞と比較してわずかに低い程度であった。頂側膜側に添加したとき、LLC-GA5-COL150細胞における細胞内蓄積量は、LLC-PK₁細胞と比較して約3倍低いものの、MDR modulator PSC833による回復は認められなかった。一方、 [³H]vinblastine の場合、LLC-GA5-COL150細胞における細胞内蓄積量は、側底膜側もしくは頂側膜側に添加したいずれの場合でも、LLC-PK₁細胞と比較して約20-70倍低く、また PSC833により顕著に回復された。

LLC-GA5-COL150細胞における側底膜から頂側膜側への [¹⁴C]KRN5500輸送は、LLC-PK₁細胞と比較してわずかに高い程度であった。また、LLC-GA5-COL150細胞における側底膜から頂側膜側への輸送は、反対方向の頂側膜から側底膜側への輸送と比較してわずかに高いだけであった。一方、 [³H]vinblastine の場合、LLC-GA5-COL150細胞における側底膜から頂側膜方向への輸送は、反対方向への輸送と比較して約20倍高く、また PSC833により顕著に阻害された。

以上の結果から、KRN5500はヒト P-gp と相互作用するものの、P-gp によってほとんど輸送されないことが明らかとなった。また、ヒト P-gp と強く相互作用し、P-gp によって輸送された vinblastine と比較した結果、KRN5500は非常に特徴的な細胞内動態を示す抗癌剤であることが明らかとなった。vinblastine は、化学療法を施行された患者においてしばしば効果が減弱することが認められていることから、KRN5500は化学療法を施行された患者に対してさえ有用であることが示唆された。さらに

近年、P-gpの基質であるがP-gpによって輸送されない薬物が報告されている。これらの薬物の細胞内の蓄積は、P-gpの発現により影響されないことが示されており、KRN5500の細胞内動態もこれら薬物と類似していることが明らかになった。従って、新規抗癌剤を開発する上で、P-gpの基質であるか否かを明確にするとともに、実際にP-gpによって輸送されるか否かまでも明確にすることが重要であると考えられる。このような目的を遂行する上で、LLC-GA5-COL150細胞を用いた本実験系は有用であることを示した。

本研究は、新規抗癌剤KRN5500とヒトP-gpとの相互作用について研究したものであるが、これまで不明であったKRN5500の特徴的な細胞内動態を明らかにするとともに、このような研究が抗癌剤を開発する上で重要であることを提唱したものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。